

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern Application No  
PCT/FR 00/01302

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 C12N1/12 A01G33/00  
A01N63/00 C12N9/02

A61K35/80

A61K7/48

A23L3/3463

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 C12N A01G A61K A23L A01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category \* Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages

Relevant to claim No.

X

EP 0 437 393 A (COMMISSARIAT ENERGIE  
ATOMIQUE ; USSI INGENIERIE ETUDES ET REAL  
(FR)) 17 July 1991 (1991-07-17)  
the whole document

1-4

A

EP 0 628 629 A (HELIOSYNTHESE SA)  
14 December 1994 (1994-12-14)  
abstract

1-17

A

FR 2 705 685 A (AMELIE LES BAINS PALALDA  
VILLE) 2 December 1994 (1994-12-02)  
abstract

1-17

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- \* "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \* "E" earlier document but published on or after the international filing date
- \* "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \* "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \* "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\* "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\* "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\* "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\* "G" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 August 2000

Date of mailing of the international search report

30/08/2000

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lejeune, R

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/01302

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0437393	A	17-07-1991	FR 2656874 A AU 641460 B AU 6922091 A DE 69114311 D DE 69114311 T ES 2080918 T IL 96779 A JP 2977288 B JP 4211366 A US 5179012 A	12-07-1991 23-09-1993 18-07-1991 14-12-1995 05-06-1996 16-02-1996 31-01-1996 15-11-1999 03-08-1992 12-01-1993
EP 0628629	A	14-12-1994	FR 2706465 A AU 686140 B AU 6345994 A IL 109945 A JP 7135970 A US 5536654 A	23-12-1994 05-02-1998 15-12-1994 06-12-1998 30-05-1995 16-07-1996
FR 2705685	A	02-12-1994	NONE	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No  
PCT/FR 00/01302

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 7 C12N1/12 A01G33/00 A61K35/80 A61K7/48 A23L3/3463  
A01N63/00 C12N9/02

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 7 C12N A01G A61K A23L A01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)  
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP 0 437 393 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE ; USSI INGENIERIE ETUDES ET REAL (FR)) 17 juillet 1991 (1991-07-17) le document en entier	1-4
A	EP 0 628 629 A (HELIOSYNTHESE SA) 14 décembre 1994 (1994-12-14) abrégé	1-17
A	FR 2 705 685 A (AMELIE LES BAINS PALALDA VILLE) 2 décembre 1994 (1994-12-02) abrégé	1-17

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

22 août 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

30/08/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Lejeune, R

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Document International No

PCT/FR 00/01302

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0437393 A	17-07-1991	FR 2656874 A	12-07-1991
		AU 641460 B	23-09-1993
		AU 6922091 A	18-07-1991
		DE 69114311 D	14-12-1995
		DE 69114311 T	05-06-1996
		ES 2080918 T	16-02-1996
		IL 96779 A	31-01-1996
		JP 2977288 B	15-11-1999
		JP 4211366 A	03-08-1992
		US 5179012 A	12-01-1993
EP 0628629 A	14-12-1994	FR 2706465 A	23-12-1994
		AU 686140 B	05-02-1998
		AU 6345994 A	15-12-1994
		IL 109945 A	06-12-1998
		JP 7135970 A	30-05-1995
		US 5536654 A	16-07-1996
FR 2705685 A	02-12-1994	AUCUN	

## PCT

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire	<b>POUR SUITE A DONNER</b> voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après	
Demande internationale n°	Date du dépôt international(jour/mois/année)	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année)
PCT/FR 00/ 01302	15/05/2000	08/06/1999
Déposant		
AQUAMER (SAEM) et al.		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 2 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

**1. Base du rapport**

- a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.
- ☐ la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.
- b. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :
- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).
3. ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

**4. En ce qui concerne le titre,**

- ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.
- ☐ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

**5. En ce qui concerne l'abrégé,**

- ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant
- ☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

**6. La figure des dessins à publier avec l'abrégé est la Figure n°**

- ☐ suggérée par le déposant.
- ☐ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.
- ☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

☒ Aucune des figures n'est à publier.



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No  
PCT/FR 00/01302

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**  
CIB 7 C12N1/12 A01G33/00 A61K35/80 A61K7/48 A23L3/3463  
A01N63/00 C12N9/02

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 7 C12N A01G A61K A23L A01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)  
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP 0 437 393 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE ; USSI INGENIERIE ETUDES ET REAL (FR)) 17 juillet 1991 (1991-07-17) le document en entier	1-4
A	EP 0 628 629 A (HELIOSYNTHESE SA) 14 décembre 1994 (1994-12-14) abrégé	1-17
A	FR 2 705 685 A (AMELIE LES BAINS PALALDA VILLE) 2 décembre 1994 (1994-12-02) abrégé	1-17

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

22 août 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

30/08/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Lejeune, R





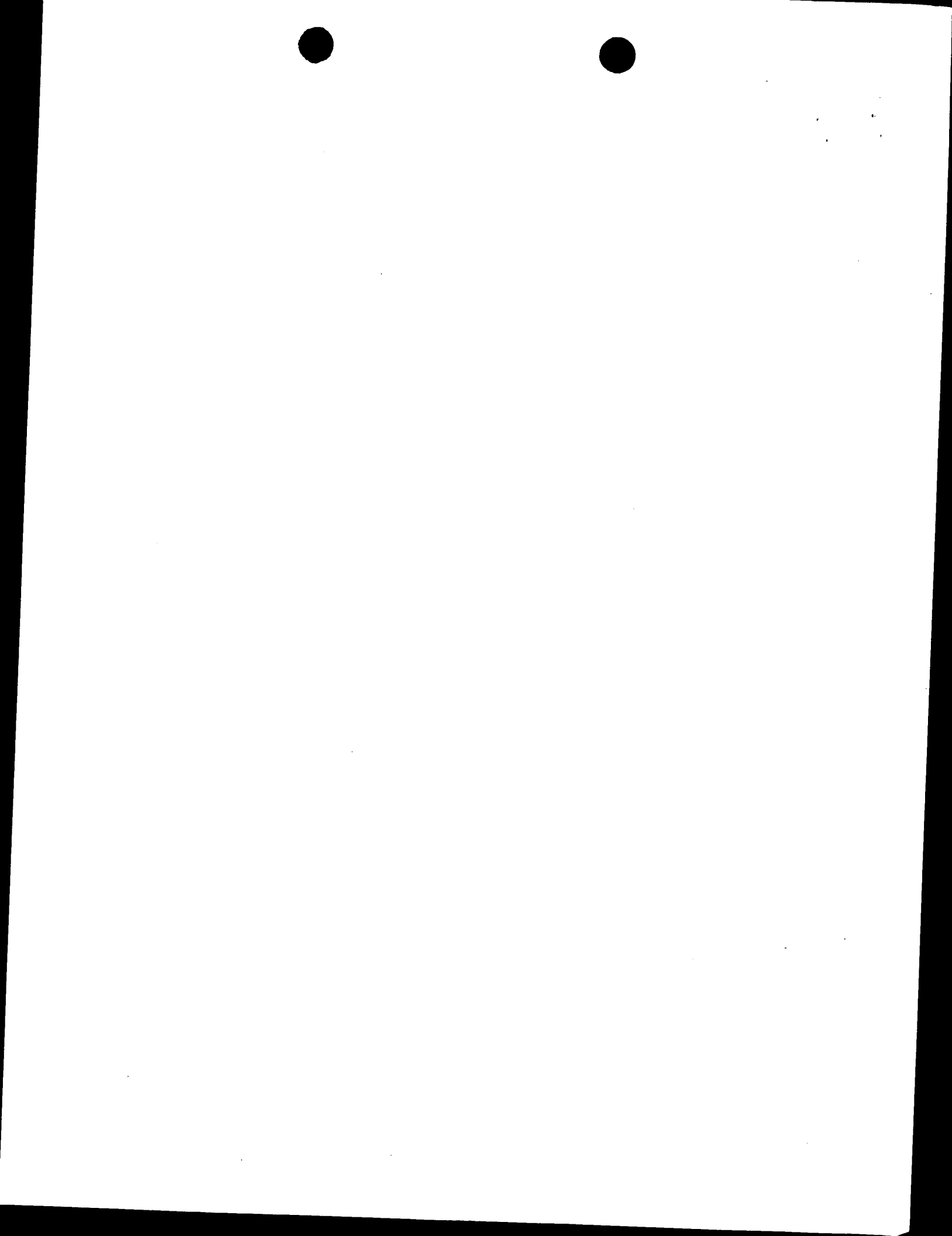
# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/JP 00/01302

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0437393	A	17-07-1991	FR 2656874 A	12-07-1991
			AU 641460 B	23-09-1993
			AU 6922091 A	18-07-1991
			DE 69114311 D	14-12-1995
			DE 69114311 T	05-06-1996
			ES 2080918 T	16-02-1996
			IL 96779 A	31-01-1996
			JP 2977288 B	15-11-1999
			JP 4211366 A	03-08-1992
			US 5179012 A	12-01-1993
EP 0628629	A	14-12-1994	FR 2706465 A	23-12-1994
			AU 686140 B	05-02-1998
			AU 6345994 A	15-12-1994
			IL 109945 A	06-12-1998
			JP 7135970 A	30-05-1995
			US 5536654 A	16-07-1996
FR 2705685	A	02-12-1994	NONE	



## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

## NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Commissioner  
US Department of Commerce  
United States Patent and Trademark  
Office, PCT  
2011 South Clark Place Room  
CP2/5C24  
Arlington, VA 22202  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE  
en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année)

26 février 2001 (26.02.01)

Demande internationale no

PCT/FR00/01302

Référence du dossier du déposant ou du mandataire

Date du dépôt international (jour/mois/année)

15 mai 2000 (15.05.00)

Date de priorité (jour/mois/année)

08 juin 1999 (08.06.99)

Déposant

POINT, Jacques etc

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:



dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

05 janvier 2001 (05.01.01)



dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection



a été faite



n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI  
34, chemin des Colombettes  
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur: (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé

Antonia Muller

no de téléphone: (41-22) 338.83.38



09/1926718  
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

37

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR00/01302	International filing date (day/month/year) 15 May 2000 (15.05.00)	Priority date (day/month/year) 08 June 1999 (08.06.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 1/12		
Applicant AQUAMER (SAEM)		

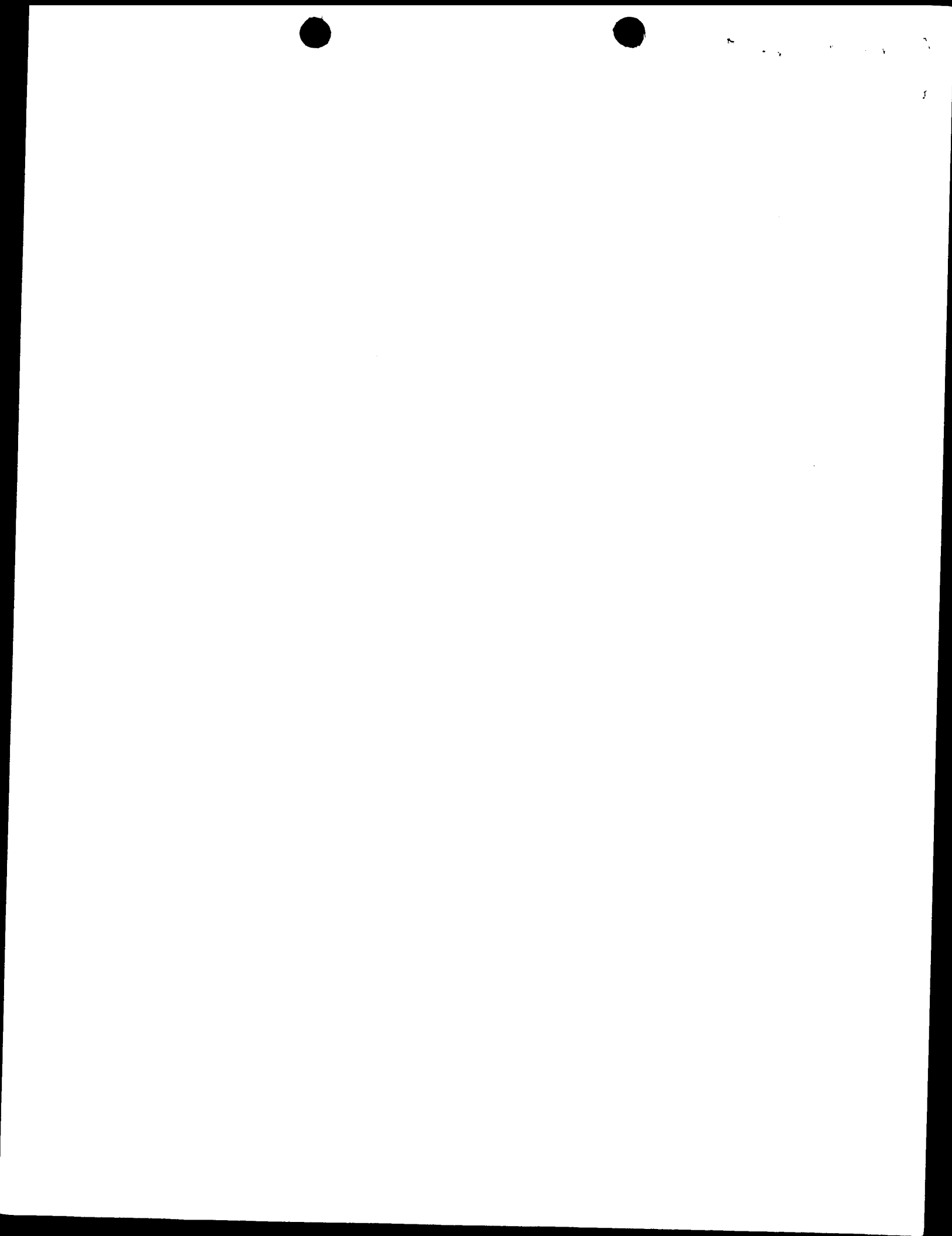
- This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
- This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet.  
  
☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 8 sheets.

- This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 05 January 2001 (05.01.01)	Date of completion of this report 09 August 2001 (09.08.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/01302

## I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:\*

☐ the international application as originally filed

☒ the description: \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages 1-6, filed with the letter of 27 July 2001 (27.07.2001)

☒ the claims: \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages 1-15, filed with the letter of 27 July 2001 (27.07.2001)

☐ the drawings: \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

☐ the sequence listing part of the description: \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.  
These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).  
☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).  
☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.  
☐ filed together with the international application in computer readable form.  
☐ furnished subsequently to this Authority in written form.  
☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.  
☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.  
☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_  
☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_  
☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.





# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/FR 00/01302

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement			
Novelty (N)	Claims	1-15	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-15	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-15	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

1. Reference is made to the following documents:

D1: EP-A-0 437 393

D2: EP-A-0 628 629

2. The subject matter of Claims 1-15 is considered to be novel and inventive under the terms of PCT Article 33(2) and (3) for the following reasons:

D1 (the closest prior art) describes a two-stage method for obtaining an extract with a high superoxide-dismutase content comprising: (i) culturing photosynthetic microalgae in a photobioreactor, wherein the gas produced in the reactor photosynthesis is removed and (ii) reinjecting the gaseous oxygen collected in a collector during the first stage into the photobioreactor to enrich the culture medium with dissolved oxygen. The extract containing superoxide-dismutases is obtained following the separation of the cultured microalgae by centrifuging and filtering same from the culture medium (page 3, lines 1-20; page 4, lines 3-42; page 5, lines 15-31; page 6, lines 1-9 and 54-58; page 7, lines 1-42, 50; page 8, lines 42-52).



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/FR 00/01302

The subject matter of Claim 1 differs from the closest prior art (D1) in that, after a period of 6 to 12 days, 100 mg/ml of potassium bicarbonate is added to the culture medium, whereafter the reactor is closed for a period of 1 to 3 days to create oxygen supersaturation.

In the method according to Claims 1-4, the oxygen supersaturation period is started after an optimal cell density is obtained in the culture medium. These culture conditions produce a metabolic forcing that leads to an overproduction of thermostable superoxide-dismutases.

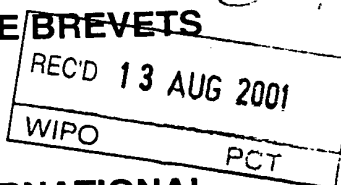
In the method described in D1, oxygen is reinjected in the photobioreactor following a lighting period (photosynthesis phase). D1 does not provide any indication concerning the thermostability of the superoxide-dismutases produced. D2 describes a method for obtaining an extract with a high thermostable superoxide-dismutase content from a culture of microalgae, based on the culture of microorganisms at a temperature of 40 to 80°C, wherein the culture medium is enriched in oxygen in a similar manner to that described in D1.

The subject matter of Claims 5-15 relates to an extract (and to the use thereof) obtained using the method of Claim 1, and it is considered to be novel and inventive under the terms of PCT Article 33(2) and (3) for the reasons mentioned above.



# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

## PCT



### RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)


Référence du dossier du déposant ou du mandataire BR00D29	<b>POUR SUITE A DONNER</b> voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR00/01302	Date du dépôt international (jour/mois/année) 15/05/2000	Date de priorité (jour/mois/année) 08/06/1999
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12N1/12		
Déposant AQUAMER (SAEM) et al.		

- Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
- Ce RAPPORT comprend 5 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
  - ☒ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

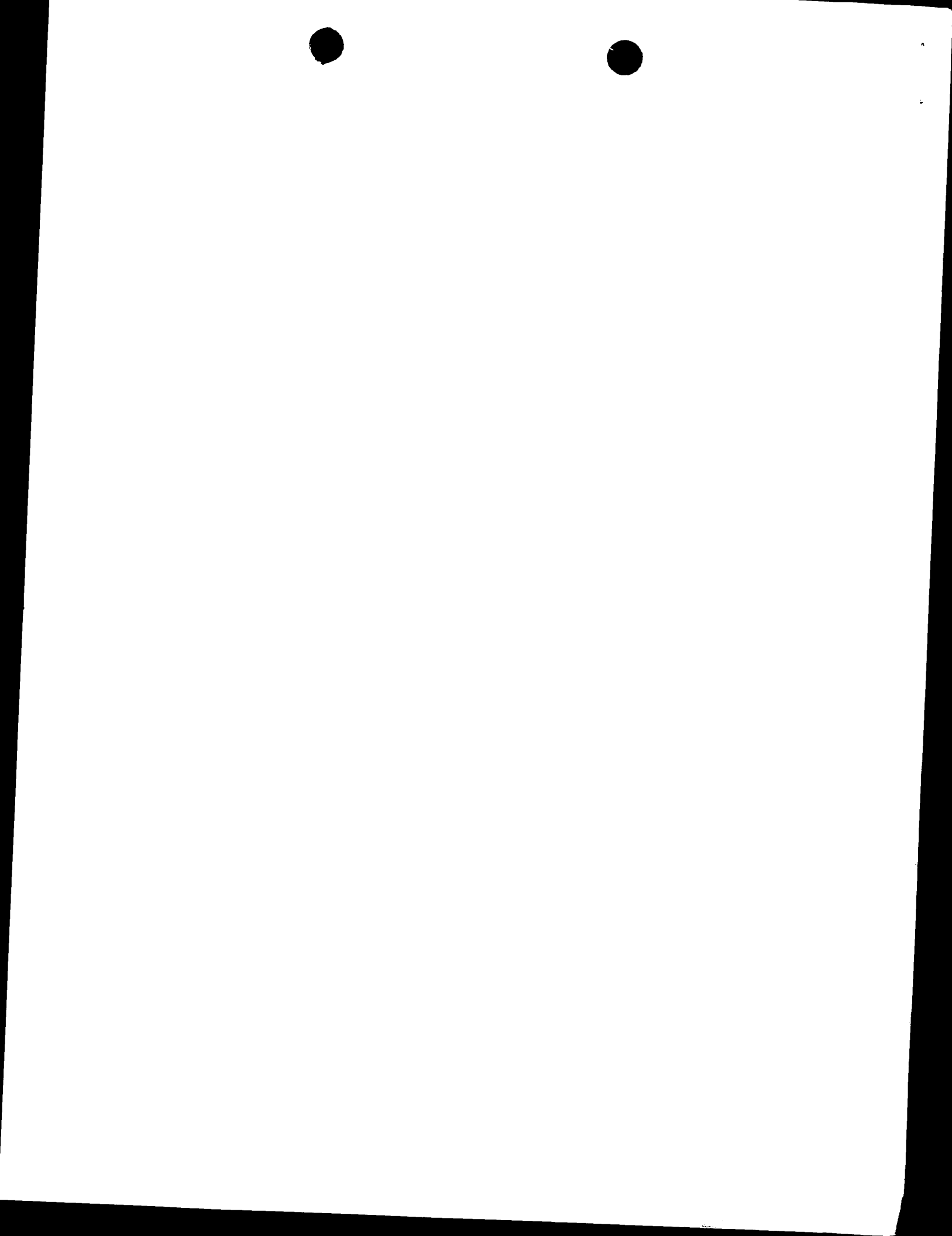
Ces annexes comprennent 8 feuilles.

- Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☐ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☐ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 05/01/2001	Date d'achèvement du présent rapport 09.08.2001
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé  Diez Schlereth, D  N° de téléphone +49 89 2399 7488





**RAPPORT D'EXAMEN  
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/01302

**I. Base du rapport**

1. En ce qui concerne les **éléments** de la demande internationale (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17)*):

**Description, pages:**

1-6                      reçue(s) le                      27/07/2001    avec la lettre du                      27/07/2001

**Revendications, N°:**

1-15                      reçue(s) le                      27/07/2001    avec la lettre du                      27/07/2001

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description,      pages :
- ☐ des revendications,    n°s :
- ☐ des dessins,              feuilles :





**RAPPORT D'EXAMEN  
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/01302

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

*(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)*

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

**V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1-15
	Non : Revendications
Activité inventive	Oui : Revendications 1-15
	Non : Revendications
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-15
	Non : Revendications

2. Citations et explications  
**voir feuille séparée**



**Concernant le point V**

1.) Il est fait référence aux documents suivants:

D1: EP-A-0 437 393

D2: EP-A-0 628 629

2.) L'objet des revendications 1-15 est considéré comme étant nouveau et inventif au sens des articles 33 (2) et (3) PCT, pour les raisons suivantes:

D1 (l'état de la technique la plus proche) décrit un procédé d'obtention d'un extrait avec une haute teneur de superoxyde-dismutases qui se déroule en deux temps, (i) on cultive des microalgues photosynthétiques dans un photobioréacteur en éliminant le gaz produit pendant la photosynthèse du réacteur, et (ii) cet oxygène gazeux, qui est récolté dans un collecteur pendant le premier temps du procédé, est réinjecté après dans le photobioréacteur pour enrichir le milieu de la culture en oxygène dissous. L'extrait contenant des superoxyde-dismutases est obtenu après la séparation des microalgues de la culture par centrifugation et la filtration du milieu de culture (p. 3, l. 1-20; p. 4, l. 3-42; p. 5, l. 15-31; p. 6, l. 1-9, 54-58; p. 7, l. 1-42, 50; p. 8, l. 42-52).

L'objet de la revendication 1 diffère de l'état de la technique le plus proche (D1) en ce qu'après une durée de 6 à 12 jours on ajoute au milieu de culture 100 mg/ml de bicarbonate de potassium, puis on ferme le réacteur pendant une durée de 1 à 3 jours pour réaliser la sursaturation en oxygène.

Dans le procédé selon les revendications 1-4 on impose la période de sursaturation en oxygène après l'obtention d'une densité cellulaire optimale du milieu de culture. Ces conditions de culture produisent un forçage métabolique qui conduit à une superproduction de superoxyde-dismutases qui sont thermostables.

Dans le procédé décrit dans D1 on réinjecte l'oxygène dans le photobioréacteur après chaque période d'éclairage (la phase de photosynthèse). D1 ne donne aucune indication concernant la thermostabilité des superoxyde-dismutases produites. D2 décrit un procédé pour l'obtention d'un extrait de haute teneur en superoxyde-dismutases thermostables à partir d'une culture de microalgues, qui est basé dans la



**RAPPORT D'EXAMEN**

Demande internationale n° PCT/FR00/01302

**PRELIMINAIRE INTERNATIONAL - FEUILLE SEPARÉE**

---

culture des microorganismes à températures entre 40-80°C en enrichissant le milieu de culture avec de l'oxygène d'une manière similaire à celle décrite dans D1.

L'objet des revendications 5-15 se rapporte à un extrait (et à l'utilisation de cet extrait) obtenu selon le procédé qui fait l'objet de la revendication 1, et il est considéré comme étant nouveau et inventif au sens des articles 33 (2) et (3) PCT, pour des raisons analogues à celles déjà mentionnées.



**PROCÉDÉ D'OBTENTION, A PARTIR DU MILIEU DE CULTURE  
DE MICRO-ALGUES, D'UN EXTRAIT THERMOSTABLE POSSÉDANT UNE  
ACTIVITÉ ANTI-OXYDANTE ET PRO-CICATRISANTE**

5 La présente invention a pour objet un procédé d'obtention, à partir  
du milieu de culture de micro-algues, d'un extrait thermostable possédant une  
activité anti-oxydante et pro-cicatrisante liée à une teneur élevée en superoxydismu-  
tases-like et en polysaccharides sulfatés, et susceptible de trouver des applications  
dans l'industrie chimique, l'industrie cosmétique, l'industrie pharmaceutique et  
10 l'industrie agronomique, ainsi que dans les domaines de la nutraceutique et de la  
diététique.

De nombreux travaux ont déjà été effectués, dans le domaine  
cosmétique, pour mettre au point des substances antiradicalaires propres  
notamment à ralentir le vieillissement cutané. Parallèlement, des recherches ont été  
15 menées dans le secteur médical pour obtenir des produits à activité  
anti-inflammatoire, aptes à être utilisés notamment en rhumatologie et dans le  
traitement de pathologies liées à des stress oxydatifs et affectant les systèmes  
digestif et cardio-vasculaire.

Les recherches entreprises ont été délibérément orientées ces  
20 dernières années vers le secteur végétal afin d'éviter les substances infectieuses qui  
risquent de se trouver dans les extraits animaux. Parmi ces recherches, la culture  
de micro-algues a conduit à l'obtention de produits intéressants à partir de la  
biomasse algale.

Le brevet N° EP 0 437 383 fait état d'un procédé et d'un photobio-  
25 réacteur destinés à la production et à l'extraction d'anti-oxydants à partir d'une  
culture de micro-organismes, le procédé consistant à cultiver dans le photobioréac-  
teur des micro-algues en suspension dans un milieu de culture en collectant  
l'oxygène produit par les micro-algues par photosynthèse pour le réinjecter ensuite  
dans le milieu de culture, à séparer les micro-algues du milieu de culture, à les  
30 mettre en solution, à broyer la solution, à ajouter un solvant pour solubiliser les  
anti-oxydants et à séparer les phases liquides en présence.

Le brevet N° EP 0 628 629 décrit un procédé de production et  
d'extraction de superoxyde-dismutases thermostables à partir d'une culture de  
micro-organismes suspendus dans un milieu de culture et choisis parmi les





-2-

micro-algues et les cyanobactéries, ce procédé consistant à cultiver dans un photoréacteur des micro-organismes thermophiles photosynthétiques aérobies producteurs d'oxygène, à extraire du milieu de culture les superoxyde-dismutases par broyage cellulaire, ultrafiltration et précipitation sélective.

5 Toutefois les techniques mises en oeuvre présentent l'inconvénient d'être complexes et de conduire au rejet du milieu de culture desdites micro-algues.

La présente invention est basée sur la découverte des propriétés inattendues du milieu de culture des micro-algues, qui peut dans certaines conditions produire des quantités importantes de superoxydismutases like (SOD like) et de polysaccharides sulfatés (PS).

10 Les superoxydismutases like (SOD like) sont des produits qui présentent le même type d'activité que les superoxydismutases (SOD), avec l'avantage sur ces dernières d'être thermostables, ce qui n'est pas le cas des enzymes en général, et des superoxydismutases en particulier.

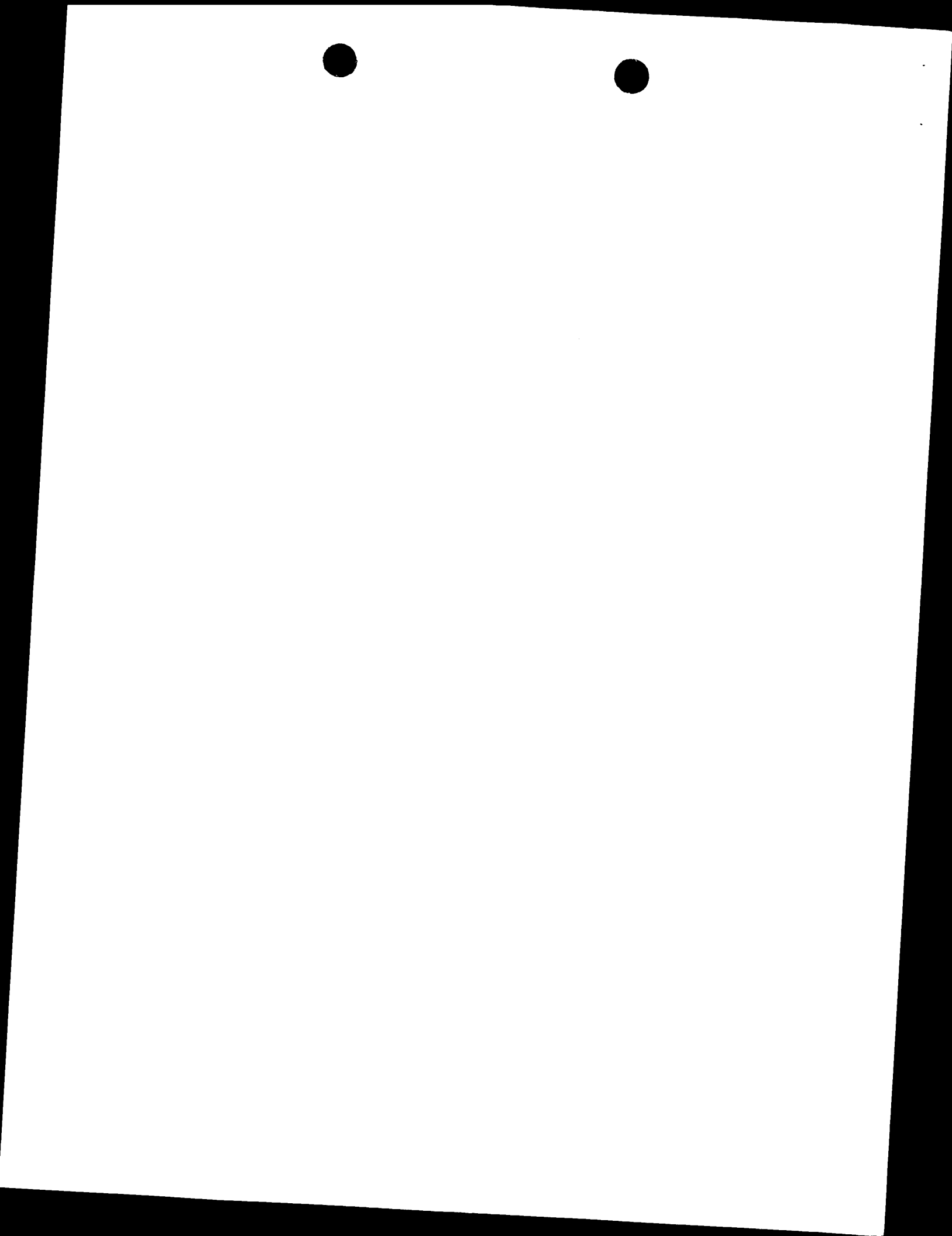
15 La présente invention a ainsi pour objet un procédé d'obtention d'un extrait du milieu de culture de micro-algues, ce procédé se caractérisant essentiellement en ce qu'il consiste à réaliser dans premier temps la culture desdites micro-algues puis à leur imposer dans un deuxième temps une sursaturation en oxygène qui produit un forçage métabolique conduisant à une surproduction de composés antioxydants.

20 Les micro-algues mises en oeuvre dans le procédé selon l'invention sont préférentiellement choisies dans le groupe des Rhodophyceae, et notamment le *Porphyridium cruentum* (PC).

25 Conformément à l'invention, la culture des micro-algues choisies s'effectue dans un photobioréacteur de type classique, dans lequel l'énergie solaire ou un éclairage approprié permet de réaliser la photosynthèse à la base de ladite culture, dans des conditions contrôlées de température de pH et d'alimentation en dioxyde de carbone CO<sub>2</sub>.

30 L'alimentation en CO<sub>2</sub> du milieu de culture, ainsi que l'agitation nécessaire au bon développement des micro-algues, peuvent être assurées par un bullage d'air enrichi en CO<sub>2</sub> comprimé ou par tout autre moyen équivalent.

Au bout d'un temps de culture suffisamment long, de l'ordre de 6 à 12 jours, lorsque la densité cellulaire du milieu de culture est optimale, on y ajoute



100 mg/l de bicarbonate de potassium, puis on ferme le réacteur et on laisse la culture se poursuivre pendant un temps de l'ordre de 1 à 3 jours afin de créer un forçage métabolique provoqué par la sursaturation du milieu en oxygène provenant de la photosynthèse, le bicarbonate de potassium apportant le carbone nécessaire à cette photosynthèse.

Les algues sont ensuite séparées du milieu de culture par centrifugation ou filtration. Une filtration à l'aide d'un filtre approprié permet ensuite de séparer l'extrait anti-oxydant.

Le filtre utilisé pour séparer l'extrait recherché peut être une membrane cellulosique à dimensions de pores de 1 à 1,5  $\mu\text{m}$ .

Le produit ainsi extrait du milieu de culture des micro-algues renferme au moins 30 unités par millilitre de SOD like, mesure effectuée à l'aide du kit commercialisé sous la dénomination "SOD-525". Il renferme en outre au moins 1 mg/ml de polysaccharides sulfatés.

La teneur élevée en SOD like de l'extrait selon l'invention lui confère des propriétés anti-inflammatoires qui peuvent trouver une application en rhumatologie, ainsi que des propriétés antiradicalaires qui peuvent être utilisées en cosmétique, dans la préparation de crèmes contre le vieillissement cutané.

D'autre part la teneur importante en polysaccharides sulfatés de l'extrait selon l'invention lui confère des propriétés de régénération tissulaire qui, associées aux propriétés antiradicalaires des SOD like, en font un excellent produit pro-cicatrisant.

Le produit selon l'invention peut également être utilisé pour renforcer les activités anti-oxydantes d'autres extraits végétaux, notamment dans la lutte biologique contre les parasites végétaux. Ainsi des produits à activité péroxydasique peuvent bénéficier d'une activité nettement accrue par addition d'environ 10% de l'extrait selon l'invention.

Le produit selon l'invention présente l'avantage d'être thermostable, notamment à 121°C pendant vingt minutes.

Selon l'application envisagée pour l'extrait selon l'invention, on peut l'utiliser tel qu'obtenu selon le procédé décrit ci-dessus. Toutefois on peut aussi séparer les composés actifs de manière à obtenir deux produits à activités différents, l'un contenant les SOD like et l'autre les polysaccharides sulfatés.



La séparation de la partie renfermant les SOD like peut s'effectuer par précipitation à l'aide d'un solvant tel que l'éthanol ou par séparation à l'aide d'une membrane organique telle qu'une membrane de cellulose, de dimensions de pores comprises entre 1 000 et 50 000 daltons. On obtient deux extraits dont l'un, 5 renfermant les SOD like, présente une activité anti-oxydante et antiradicalaire, tandis que l'autre renfermant les polysaccharides sulfatés, présente une activité de régénération tissulaire.

La présente invention sera mieux comprise à la lumière de exemples qui suivent, fournis à titre de simple illustration de l'invention, vis-à-vis de laquelle ils 10 ne présentent aucun caractère limitatif.

### EXEMPLE 1

#### Obtention d'un extrait du milieu de culture de *Porphyridium*

##### 15 *cruentum* (PC)

Dans un photobioréacteur de 150 litres, l'algue est cultivée dans un milieu type Conway-eau de mer artificielle. L'inoculation est faite par 5 l de culture à 5 millions de cellules par millilitre. Un bullage d'air est assuré par l'énergie solaire ou par des lampes distribuant 100  $\mu$  moles/m<sup>2</sup>/s.

20 Au bout de 12 jours, lorsque la densité cellulaire est optimale, on rajoute 100 mg par litre, soit 15 g de KHCO<sub>3</sub>, puis on ferme le réacteur et on laisse la culture se poursuivre pendant 2 jours afin de créer un forçage métabolique.

Après ce temps, les algues sont séparées par centrifugation du milieu de culture, puis ce dernier est filtré sur membrane cellulosique à pores de 1,2

25  $\mu$ m.

L'extrait ainsi obtenu présente une teneur en SOD like de 30 U/ml, mesurée au kit SOD-525, et une teneur en polysaccharides sulfatés de 1 mg/ml.

Cet extrait peut être stérilisé à 121°C pendant 20 minutes, puis conditionné en flacons stériles, sans que cette opération modifie l'activité SOD, ni

30 la teneur en PS.

Il peut aussi être déshydraté par lyophilisation pour être ensuite utilisé dans la préparation de compositions tels que des comprimés.



**EXEMPLE 2****Séparation des activités**

A partir de 10 litres de l'extrait obtenu à l'exemple 1, on sépare par traitement à l'éthanol la partie SOD like des polysaccharides sulfatés, qui précipitent.

5 On obtient ainsi deux extraits, dont l'un présente une activité antiradicalaire non altérée par la séparation, et l'autre renferme les polysaccharides sulfatés et présente une activité de régénération tissulaire.

Chacun des deux extraits peut être conservé sous forme aqueuse, après stérilisation et conditionnement en flacons stériles.

10 Les extraits peuvent aussi être conservés sous forme de poudre soluble, après lyophilisation.

**EXEMPLE 3****PRODUITS COMÉTIQUES****1) Crème anti-vieillessement cutané.**

15 Dans un malaxeur approprié on réalise le mélange suivant, exprimé en pourcentage en poids :

	EXTRAIT selon l'exemple 1	10
	PEG-8 BEESWAX	8
20	OCTYDODECYL MYRISTATE	10
	ISOSTEARYL ISOSTERARATE	10
	SODIUM HYDROXIDE	0,4
	ETHOXYDIGLYCOL	5
	EAU, PARFUM, CONSERVATEUR	QSP 100

25 Une objectivation in vitro de la crème ainsi obtenue permet de constater une prolifération de fibroblastes, même en présence d'agents anti-prolifératifs introduits dans le milieu, ce qui constitue l'indice d'un effet trophique et pro-reconstituant.

**2) Brumisateurs adoucissants pour peau fragilisée**

30 On conditionne le liquide de l'exemple 1 dans un flacon propulseur à l'azote.





-6-

**EXEMPLE 4****Composition diététique anti-stress oxydatif**

A l'aide de l'extrait obtenu à l'exemple 1 on réalise des gélules de 250 mg de poudre, destinées à la nutraceutique et à la parapharmacie.

5 Des essais effectués sur rats, à raison d'une administration journalière de 5 mg de poudre, ont permis d'observer une augmentation des substances antiradicalaires dans le plasma sanguin.

**EXEMPLE 5****Collyre anti-inflammatoire**

10 On prépare un collyre selon la formulation suivante :

Gluconate de chlorhexidine 0,005 g

Inosine phosphate disodique déshydraté 0,5 g

Extrait liquide selon l'exemple 1 qsq 100 ml

15 Le collyre ainsi obtenu peut être utilisé dans le traitement des conjonctivites.

**EXEMPLE 6****Produit alimentaire**

20 A un concentré de 50 degrés Brix de tomates on ajoute 0,1% en poids de la poudre de l'exemple 1, afin d'accroître sa durée de conservation.

**EXEMPLE 7****Composition contre les parasites végétaux**

25 L'extrait renfermant les PS de l'exemple 2 appliqué à des végétaux comme le melon ou la vigne induit une activité peroxydasique qui est le signe d'une résistance potentielle à des parasites comme les champignons.

**EXEMPLES 8****Application aux polymères**

30 L'extrait obtenu à l'exemple 1 peut, après déshydratation, être incorporé à des polymères pour augmenter leur résistance à l'oxydation.



## REVENDEICATIONS

1°. Procédé d'obtention à partir du milieu de culture de micro-algues,  
5 d'un extrait thermostable possédant une activité anti-oxydante et pro-cicatrisante,  
consistant à réaliser dans un premier temps la culture desdites micro-algues dans  
un photobioréacteur soumis à un éclairage approprié et à des conditions contrôlées  
de température, de pH et d'alimentation en dioxyde de carbone CO<sub>2</sub>, à leur imposer  
dans un deuxième temps une sursaturation en oxygène, puis à séparer les algues  
10 du milieu de culture par centrifugation, et enfin à filtrer ledit milieu de culture sur un  
filtre approprié pour séparer ledit extrait,

caractérisé en ce qu'après une durée de six à douze jours, on ajoute  
au milieu de culture 100 mg/l de bicarbonate de potassium, puis on ferme le réacteur  
pendant une durée de un à trois jours pour réaliser la sursaturation en oxygène.

15

2°. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que  
l'éclairage de photobioréacteur est réalisé par l'énergie solaire.

3°. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que  
20 l'alimentation en CO<sub>2</sub> est réalisé par bullage d'air enrichi en CO<sub>2</sub> comprimé.

4°. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la  
filtration du milieu de culture après la centrifugation destinée à en séparer les algues  
s'effectue sur un filtre constitué d'une membrane cellulosique à dimensions de pores  
25 comprises entre 1 et 1,5 µm.

5°. Extrait à propriétés anti-oxydantes et pro-cicatrisantes obtenu  
selon le procédé qui fait l'objet des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il  
renferme au moins 30 U/ml de superoxydismutases like (SOD like) et au moins 1  
30 mg/ml de polysaccharides sulfatés.

6°. Extrait à propriétés anti-radicalaires obtenu à partir de l'extrait  
selon la revendication 5 par précipitation à l'aide d'un solvant ou par séparation à



l'aide d'une membrane cellulosique, caractérisé en ce qu'il renferme au moins 30 U/ml de SOD like.

5 7°. Extrait à propriétés de régénération tissulaire obtenu à partir de l'extrait selon la revendication 5 par précipitation à l'aide d'un solvant ou par séparation à l'aide d'une membrane cellulosique, caractérisé en ce qu'il renferme au moins 1 mg/ml de polysaccharides sulfatés.

10 8°. Extrait selon la revendication 6 ou la revendication 7, caractérisé en ce que la séparation est réalisée à l'aide d'une membrane cellulosique à dimensions de pores comprises entre 1 000 et 50 000 daltons.

15 9°. Extrait selon la revendication 6 ou la revendication 7, caractérisé en ce que la précipitation est réalisée à l'aide d'éthanol.

10°. Utilisation de l'extrait selon la revendication 5 comme anti-oxydant dans la fabrication des polymères.

20 11°. Utilisation de l'extrait selon la revendication 5 ou la revendication 6 dans la préparation de compositions diététiques anti-stress oxydatif.

12°. Utilisation de l'extrait selon la revendication 5 ou la revendication 6 pour la conservation de produits alimentaires.

25 13°. Utilisation de l'extrait selon la revendication 5 dans la préparation de produits de produits cosmétiques destinés à ralentir le vieillissement cutané.

30 14°. Utilisation de l'extrait selon la revendication 5 dans la préparation de compositions anti-inflammatoires, notamment en rhumatologie.

15°. Utilisation de l'extrait selon la revendication 7 dans la préparation de compositions destinées à la lutte biologique contre les parasites végétaux.



## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION RELATIVE  
A LA PRESENTATION OU A LA TRANSMISSION  
DU DOCUMENT DE PRIORITE

(Instruction administrative 411 du PCT)

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

CABINET ROMAN  
35, rue Paradis  
Boîte postale 2224  
F-13207 Marseille Cedex 01  
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 21 juin 2000 (21.06.00)	NOTIFICATION IMPORTANTE
Référence du dossier du déposant ou du mandataire	
Demande internationale no PCT/FR00/01302	
Date de publication internationale (jour/mois/année) Pas encore publiée	
Déposant AQUAMER (SAEM) etc	Date du dépôt international (jour/mois/année) 15 mai 2000 (15.05.00)
	Date de priorité (jour/mois/année) 08 juin 1999 (08.06.99)

1. La date de réception (sauf lorsque les lettres "NR" figurent dans la colonne de droite) par le Bureau international du ou des documents de priorité correspondant à la ou aux demandes énumérées ci-après est notifiée au déposant. Sauf indication contraire consistant en un astérisque figurant à côté d'une date de réception, ou les lettres "NR", dans la colonne de droite, le document de priorité en question a été présenté ou transmis au Bureau international d'une manière conforme à la règle 17.1.a) ou b).
2. Ce formulaire met à jour et remplace toute notification relative à la présentation ou à la transmission du document de priorité qui a été envoyée précédemment.
3. Un astérisque(\*) figurant à côté d'une date de réception dans la colonne de droite signale un document de priorité présenté ou transmis au Bureau international mais de manière non conforme à la règle 17.1.a) ou b). Dans ce cas, l'attention du déposant est appelée sur la règle 17.1.c) qui stipule qu'aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.
4. Les lettres "NR" figurant dans la colonne de droite signalent un document de priorité que le Bureau international n'a pas reçu ou que le déposant n'a pas demandé à l'office récepteur de préparer et de transmettre au Bureau international, conformément à la règle 17.1.a) ou b), respectivement. Dans ce cas, l'attention du déposant est appelée sur la règle 17.1.c) qui stipule qu'aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.

<u>Date de priorité</u>	<u>Demande de priorité n°</u>	<u>Pays, office régional ou</u> <u>office récepteur selon le PCT</u>	<u>Date de réception du</u> <u>document de priorité</u>
08 juin 1999 (08.06.99)	99/07372	FR	06 juin 2000 (06.06.00)

Bureau international de l'OMPI  
34, chemin des Colombettes  
1211 Genève 20, Suisse  
no de télécopieur (41-22) 740.14.35  
Formulaire PCT/IB/304 (juillet 1998)

Fonctionnaire autorisé:

Philippe Bécamel

no de téléphone (41-22) 338.83.38

003368780





## TRAITE DE OPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

AVIS INFORMANT LE DEPOSANT DE LA  
COMMUNICATION DE LA DEMANDE  
INTERNATIONALE AUX OFFICES DESIGNES

(règle 47.1.c), première phrase, du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

CABINET ROMAN

35, rue Paradis

Boîte postale 2224

F-13207 Marseille Cedex 01

FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année)

14 décembre 2000 (14.12.00)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire

AVIS IMPORTANT

Demande internationale no  
PCT/FR00/01302Date du dépôt international (jour/mois/année)  
15 mai 2000 (15.05.00)Date de priorité (jour/mois/année)  
08 juin 1999 (08.06.99)

Déposant

AQUAMER (SAEM) etc

1. Il est notifié par la présente qu'à la date indiquée ci-dessus comme date d'expédition de cet avis, le Bureau international a communiqué, comme le prévoit l'article 20, la demande internationale aux offices désignés suivants:
- US

Conformément à la règle 47.1.c), troisième phrase, ces offices acceptent le présent avis comme preuve déterminante du fait que la communication de la demande internationale a bien eu lieu à la date d'expédition indiquée plus haut, et le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale à l'office ou aux offices désignés.

2. Les offices désignés suivants ont renoncé à l'exigence selon laquelle cette communication doit être effectuée à cette date:
- CA,EP,JP

La communication sera effectuée seulement sur demande de ces offices. De plus, le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale aux offices en question (règle 48.1.a-bis)).

3. Le présent avis est accompagné d'une copie de la demande internationale publiée par le Bureau international le 14 décembre 2000 (14.12.00) sous le numéro WO 00/75282

**RAPPEL CONCERNANT LE CHAPITRE II (article 31.2)a) et règle 54.2)**

Si le déposant souhaite reporter l'ouverture de la phase nationale jusqu'à 30 mois (ou plus pour ce qui concerne certains offices) à compter de la date de priorité, la demande d'examen préliminaire international doit être présentée à l'administration compétente chargée de l'examen préliminaire international avant l'expiration d'un délai de 18 mois à compter de la date de priorité.

Il appartient exclusivement au déposant de veiller au respect du délai de 18 mois.

Il est à noter que seul un déposant qui est ressortissant d'un Etat contractant du PCT lié par le chapitre II ou qui y a son domicile peut présenter une demande d'examen préliminaire international.

**RAPPEL CONCERNANT L'OUVERTURE DE LA PHASE NATIONALE (article 22 ou 39.1))**

Si le déposant souhaite que la demande internationale procède en phase nationale, il doit, dans le délai de 20 mois ou de 30 mois, ou plus pour ce qui concerne certains offices, accomplir les actes mentionnés dans ces dispositions auprès de chaque office désigné ou élu.

Pour d'autres informations importantes concernant les délais et les actes à accomplir pour l'ouverture de la phase nationale, voir l'annexe du formulaire PCT/IB/301 (Notification de la réception de l'exemplaire original) et le volume II du Guide du déposant du PCT.

Bureau international de l'OMPI  
34, chemin des Colombettes  
1211 Genève 20, Suisse

Fonctionnaire autorisé

J. Zahra

no de télécopieur (41-22) 740.14.35

no de téléphone (41-22) 338.83.38

Formulaire PCT/IB/308 (juillet 1996)

3708857

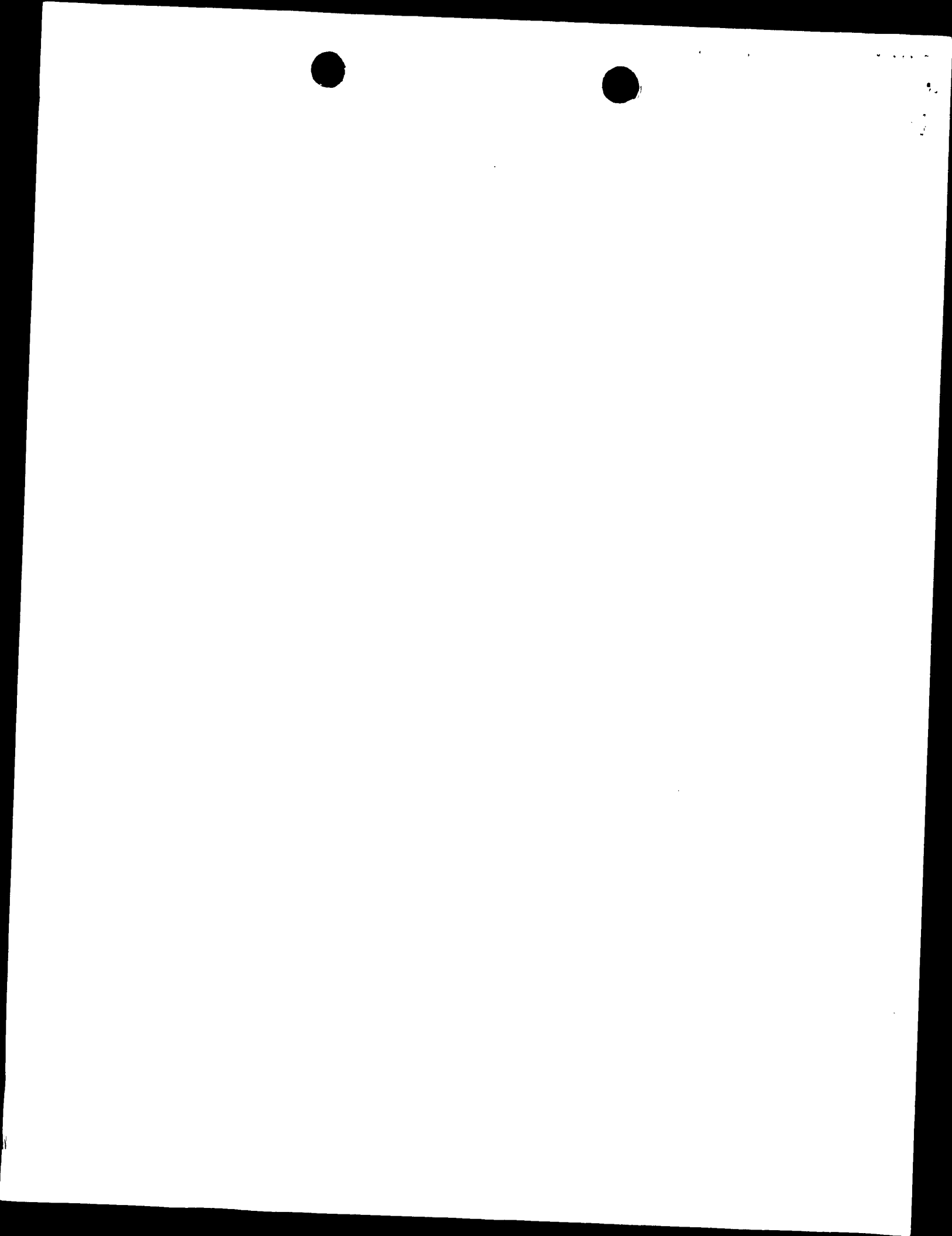


# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Informative patent family members

Intern: Application No  
PCT/00/01302

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0437393 A	17-07-1991	FR 2656874 A	12-07-1991
		AU 641460 B	23-09-1993
		AU 6922091 A	18-07-1991
		DE 69114311 D	14-12-1995
		DE 69114311 T	05-06-1996
		ES 2080918 T	16-02-1996
		IL 96779 A	31-01-1996
		JP 2977288 B	15-11-1999
		JP 4211366 A	03-08-1992
		US 5179012 A	12-01-1993
EP 0628629 A	14-12-1994	FR 2706465 A	23-12-1994
		AU 686140 B	05-02-1998
		AU 6345994 A	15-12-1994
		IL 109945 A	06-12-1998
		JP 7135970 A	30-05-1995
		US 5536654 A	16-07-1996
FR 2705685 A	02-12-1994	NONE	



(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
14 décembre 2000 (14.12.2000)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 00/75282 A1**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup>: C12N 1/12,  
A01G 33/00, A61K 35/80, 7/48, A23L 3/3463, A01N  
63/00, C12N 9/02

Jacques [FR/FR]; 48, rue de Nierme, F-01100 Oyonnax  
(FR). BACCOU, Jean-Claude [FR/FR]; 82, rue Azalais  
d'Altier, F-34080 Montpellier (FR). BAROUX, Bruno  
[FR/FR]; 15, allée du Biau, F-34580 Saussan (FR).

(21) Numéro de la demande internationale:  
PCT/FR00/01302

(74) Mandataire: CABINET ROMAN; 35, rue Paradis, Boîte  
postale 2224, F-13207 Marseille Cedex 01 (FR).

(22) Date de dépôt international: 15 mai 2000 (15.05.2000)

(25) Langue de dépôt: français

(81) États désignés (*national*): CA, JP, US.

(26) Langue de publication: français

(84) États désignés (*régional*): brevet européen (AT, BE, CH,  
CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,  
SE).

(30) Données relatives à la priorité:  
99/07372 8 juin 1999 (08.06.1999) FR

Publiée:

— Avec rapport de recherche internationale.

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*):  
AQUAMER (SAEM) [FR/FR]; Station de Lagunage de  
Méze, F-34140 Meze (FR).

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.*

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*): POINT,

(54) Title: METHOD FOR OBTAINING FROM A CULTURE MEDIUM OF MICROALGAE, A HEAT-STABLE EXTRACT  
WITH ANTIOXIDANT AND WOUND HEALING ACTIVITY

(54) Titre: PROCEDE D'OBTENTION, A PARTIR DU MILIEU DE CULTURE DE MICRO-ALGUES, D'UN EXTRAIT THER-  
MOSTABLE POSSEDANT UNE ACTIVITE ANTI-OXYDANTE ET PRO-CICATRISANTE

(57) Abstract: The invention concerns a method for obtaining, from a culture medium of microalgae, a heat-stable extract having an  
antioxidant and wound healing activity. The method consists in: first producing said culture of microalgae; then subjecting them to  
oxygen supersaturation; next separating the algae from the culture medium by centrifuging; and finally filtering the culture medium  
on an appropriate filter for separating the extract.

(57) Abrégé: Il consiste à réaliser dans un premier temps la culture desdites micro-algues, à leur imposer dans un deuxième temps  
une sursaturation en oxygène, puis à séparer les algues du milieu de culture par centrifugation, et enfin à filtrer le milieu de culture  
sur un filtre approprié pour séparer l'extrait.

WO 00/75282 A1



**PROCEDE D'OBTENTION, A PARTIR DU MILIEU DE CULTURE DE MICRO-ALGUES, D'UN EXTRAIT THERMOSTABLE POSSEDANT UNE ACTIVITE ANTI-OXYDANTE ET PRO-CICATRISANTE.**

5 La présente invention a pour objet un procédé d'obtention, à partir du milieu de culture de micro-algues, d'un extrait thermostable possédant une activité anti-oxydante et pro-cicatrisante liée à une teneur élevée en superoxydismutases-like et en polysaccharides sulfatés, et susceptible de trouver des applications dans l'industrie chimique, l'industrie cosmétique, l'industrie  
10 pharmaceutique et l'industrie agronomique, ainsi que dans les domaines de la nutraceutique et de la diététique.

De nombreux travaux ont déjà été effectués, dans le domaine cosmétique, pour mettre au point des substances antiradicalaires propres notamment à ralentir le vieillissement cutané. Parallèlement, des recherches ont été  
15 menées dans le secteur médical pour obtenir des produits à activité anti-inflammatoire, aptes à être utilisés notamment en rhumatologie et dans le traitement de pathologies liées à des stress oxydatifs et affectant les systèmes digestif et cardiovasculaire.

Les recherches entreprises ont été délibérément orientées ces  
20 dernières années vers le secteur végétal afin d'éviter les substances infectieuses qui risquent de se trouver dans les extraits animaux

Parmi ces recherches, la culture de micro-algues a conduit à l'obtention de produits intéressants à partir de la biomasse algale. Toutefois les techniques mises en oeuvre présentent l'inconvénient d'être complexes et de  
25 conduire au rejet du milieu de culture desdites micro-algues.

La présente invention est basée sur la découverte des propriétés inattendues du milieu de culture des micro-algues, qui peut dans certaines conditions produire des quantités importantes de superoxydismutases like (SOD like) et de polysaccharides sulfatés (PS).

30 Les superoxydismutases like (SOD like) sont des produits qui présentent le même type d'activité que les superoxydismutases (SOD), avec l'avantage sur ces dernières d'être thermostables, ce qui n'est pas le cas des enzymes en général, et des superoxydismutases en particulier.

La présente invention a ainsi pour objet un procédé d'obtention d'un extrait du milieu de culture de micro-algues, ce procédé se caractérisant essentiellement en ce qu'il consiste à réaliser dans premier temps la culture desdites micro-algues puis à leur imposer dans un deuxième temps une sursaturation en oxygène qui produit un forçage métabolique conduisant à une surproduction de composés antioxydants.

Les micro-algues mises en oeuvre dans le procédé selon l'invention sont préférentiellement choisies dans le groupe des Rhodophyceae, et notamment le *Porphyridium cruentum* (PC).

Conformément à l'invention, la culture des micro-algues choisies s'effectue dans un photobioréacteur de type classique, dans lequel l'énergie solaire ou un éclairage approprié permet de réaliser la photosynthèse à la base de ladite culture, dans des conditions contrôlées de température de pH et d'alimentation en dioxyde de carbone CO<sup>2</sup>.

L'alimentation en CO<sup>2</sup> du milieu de culture, ainsi que l'agitation nécessaire au bon développement des micro-algues, peuvent être assurées par un bullage d'air enrichi en CO<sup>2</sup> comprimé ou par tout autre moyen équivalent.

Au bout d'un temps de culture suffisamment long, de l'ordre de 6 à 12 jours, lorsque la densité cellulaire du milieu de culture est optimale, on y ajoute 100 mg/l de bicarbonate de potassium, puis on ferme le réacteur et on laisse la culture se poursuivre pendant un temps de l'ordre de 1 à 3 jours afin de créer un forçage métabolique provoqué par la sursaturation du milieu en oxygène provenant de la photosynthèse, le bicarbonate de potassium apportant le carbone nécessaire à cette photosynthèse.

Les algues sont ensuite séparées du milieu de culture par centrifugation ou filtration. Une filtration à l'aide d'un filtre approprié permet ensuite de séparer l'extrait anti-oxydant.

Le filtre utilisé pour séparer l'extrait recherché peut être une membrane cellulosique à dimensions de pores de 1 à 1,5 µm.

Le produit ainsi extrait du milieu de culture des micro-algues renferme au moins 30 unités par millilitre de SOD like, mesure effectuée à l'aide du kit commercialisé sous la dénomination "SOD-525". Il renferme en outre au moins 1 mg/ml de polysaccharides sulfatés.



La teneur élevée en SOD like de l'extrait selon l'invention lui confère des propriétés anti-inflammatoires qui peuvent trouver une application en rhumatologie, ainsi que des propriétés antiradicalaires qui peuvent être utilisées en cosmétique, dans la préparation de crèmes contre le vieillissement cutané.

5 D'autre part la teneur importante en polysaccharides sulfatés de l'extrait selon l'invention lui confère des propriétés de régénération tissulaire qui, associées aux propriétés antiradicalaires des SOD like, en font un excellent produit pro-cicatrisant.

10 Le produit selon l'invention peut également être utilisé pour renforcer les activités anti-oxydantes d'autres extraits végétaux, notamment dans la lutte biologique contre les parasites végétaux. Ainsi des produits à activité peroxydasique peuvent bénéficier d'une activité nettement accrue par addition d'environ 10% de l'extrait selon l'invention.

15 Le produit selon l'invention présente l'avantage d'être thermostable, notamment à 121°C pendant vingt minutes.

Selon l'application envisagée pour l'extrait selon l'invention, on peut l'utiliser tel qu'obtenu selon le procédé décrit ci-dessus. Toutefois on peut aussi séparer les composés actifs de manière à obtenir deux produits à activités différents, l'un contenant les SOD like et l'autre les polysaccharides sulfatés.

20 La séparation de la partie renfermant les SOD like peut s'effectuer par précipitation à l'aide d'un solvant tel que l'éthanol ou par séparation à l'aide d'une membrane organique telle qu'une membrane de cellulose, de dimensions de pores comprises entre 1 000 et 50 000 daltons. On obtient deux extraits dont l'un, renfermant les SOD like, présente une activité anti-oxydante et antiradicalaire, tandis  
25 que l'autre renfermant les polysaccharides sulfatés, présente une activité de régénération tissulaire.

La présente invention sera mieux comprise à la lumière de exemples qui suivent, fournis à titre de simple illustration de l'invention, vis-à-vis de laquelle ils ne présentent aucun caractère limitatif.

### EXEMPLE 1

#### Obtention d'un extrait du milieu de culture de *Porphyridium cruentum* (PC)

Dans un photobioréacteur de 150 litres, l'algue est cultivée dans un milieu type Conway - eau de mer artificielle. L'inoculation est faite par 5 l de culture à 5 millions de cellules par millilitre. Un bullage d'air est assuré par l'énergie solaire ou par des lampes distribuant  $100 \mu \text{ moles/m}^2/\text{s}$ .

Au bout de 12 jours, lorsque la densité cellulaire est optimale, on rajoute 100 mg par litre, soit 15 g de  $\text{KHCO}_3$ , puis on ferme le réacteur et on laisse la culture se poursuivre pendant 2 jours afin de créer un forçage métabolique.

Après ce temps, les algues sont séparées par centrifugation du milieu de culture, puis ce dernier est filtré sur membrane cellulosique à pores de  $1,2 \mu\text{m}$ .

L'extrait ainsi obtenu présente une teneur en SOD like de 30 U/ml, mesurée au kit SOD-525, et une teneur en polysaccharides sulfatés de 1 mg/ml.

Cet extrait peut être stérilisé à  $121^\circ\text{C}$  pendant 20 minutes, puis conditionné en flacons stériles, sans que cette opération modifie l'activité SOD, ni la teneur en PS.

Il peut aussi être déshydraté par lyophilisation pour être ensuite utilisé dans la préparation de compositions tels que des comprimés.

### EXEMPLE 2

#### Séparation des activités

A partir de 10 Litres de l'extrait obtenu à l'exemple 1, on sépare par traitement à l'éthanol la partie SOD like des polysaccharides sulfatés, qui précipitent.

On obtient ainsi deux extraits, dont l'un présente une activité antiradicalaire non altérée par la séparation, et l'autre renferme les polysaccharides sulfatés et présente une activité de régénération tissulaire.

Chacun des deux extraits peut être conservé sous forme aqueuse, après stérilisation et conditionnement en flacons stériles.

Les extraits peuvent aussi être conservés sous forme de poudre soluble, après lyophilisation.

### EXEMPLE 3

#### PRODUITS COSMETIQUES

##### 1) Crème anti-vieillessement cutané.

Dans un malaxeur approprié on réalise le mélange suivant, exprimé

5 en pourcentage en poids :

	EXTRAIT selon l'exemple 1	10
	PEG -8 BEESWAX	8
	OCTYDODECYL MYRISTATE	10
	ISOSTEARYL ISOSTERARATE	10
10	SODIUM HYDROXIDE	0,4
	ETHOXYDIGLYCOL	5
	EAU, PARFUM, CONSERVATEUR	QSP 100

Une objectivation in vitro de la crème ainsi obtenue permet de constater une prolifération de fibroblastes, même en présence d'agents anti-prolifératifs introduits dans le milieu, ce qui constitue l'indice d'un effet trophique et pro-reconstituant.

##### 2) Brumisateurs adoucissants pour peau fragilisée

On conditionne le liquide de l'exemple 1 dans un flacon propulseur à l'azote.

20

### EXEMPLE 4

#### Composition diététique anti-stress oxydatif

A l'aide de l'extrait obtenu à l'exemple 1 on réalise des gélules de 250 mg de poudre, destinées à la nutraceutique et à la parapharmacie.

Des essais effectués sur rats, à raison d'une administration journalière de 5 mg de poudre, ont permis d'observer une augmentation des substances antiradicalaires dans le plasma sanguin.

25

### EXEMPLE 5

#### Collyre anti-inflammatoire

30

On prépare un collyre selon la formulation suivante :

Gluconate de chlorhexidine	0,005 g
Inosine phosphate disodique déshydraté	0,5 g
Extrait liquide selon l'exemple 1 qsq	100 ml

Le collyre ainsi obtenu peut être utilisé dans le traitement des conjonctivites.

#### **EXEMPLE 6**

##### **Produit alimentaire**

5           A un concentré de 50 degrés Brix de tomates on ajoute 0,1% en poids de la poudre de l'exemple 1, afin d'accroître sa durée de conservation.

#### **EXEMPLE 7**

##### **Composition contre les parasites végétaux**

10           L'extrait renfermant les PS de l'exemple 2 appliqué à des végétaux comme le melon ou la vigne induit une activité péroxydasique qui est le signe d'une résistance potentielle à des parasites comme les champignons.

#### **EXEMPLE 8**

##### **Application aux polymères**

15           L'extrait obtenu à l'exemple 1 peut, après déshydratation, être incorporé à des polymères pour augmenter leur résistance à l'oxydation.

## REVENDEICATIONS

1) Procédé d'obtention à partir du milieu de culture de micro-algues, d'un extrait thermostable possédant une activité anti-oxydante et pro-cicatrisante, caractérisé en ce qu'il consiste à réaliser dans un premier temps la culture desdites micro-algues, à leur imposer dans un deuxième temps une sursaturation en oxygène, puis à séparer les algues du milieu de culture par centrifugation, et enfin à filtrer ledit milieu de culture sur un filtre approprié pour séparer ledit extrait.

2) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la culture des micro-algues s'effectue dans un photobioréacteur soumis à un éclairage approprié, dans des conditions contrôlées de température, de pH et d'alimentation en dioxyde de carbone CO<sup>2</sup>.

3) Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'éclairage de photobioréacteur est réalisé par l'énergie solaire ou par un éclairage approprié.

4) Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'alimentation en CO<sup>2</sup> est réalisée par bullage d'air enrichi en CO<sup>2</sup> comprimé.

5) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'après une durée de 10 à 12 jours on ajoute au milieu de culture 100 mg/l de bicarbonate de potassium, puis on ferme le réacteur pendant une durée de 1 à 3 jours pour réaliser la sursaturation en oxygène.

6) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la filtration du milieu de culture après la centrifugation destinée à en séparer les algues s'effectue sur un filtre constitué d'une membrane cellulosique à dimensions de pores comprises entre 1 et 1,5 µm.

7) Extrait à propriétés anti-oxydantes et pro-cicatrisantes obtenu selon le procédé qui fait l'objet des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il renferme au moins 30 U/ml de superoxydismutases like (SOD like) et au moins 1 mg/ml de polysaccharides sulfatés.

8) Extrait à propriétés anti-radicalaires obtenu à partir de l'extrait selon la revendication 7 par précipitation à l'aide d'un solvant ou par séparation à l'aide d'une membrane cellulosique, caractérisé en ce qu'il renferme au moins 30 U/ml de SOD like.

9) Extrait à propriétés de régénération tissulaire obtenu à partir de l'extrait selon la revendication 7, par précipitation à l'aide d'un solvant ou par

séparation à l'aide d'une membrane cellulosique, caractérisé en ce qu'il renferme au moins 1 mg/ml de polysaccharides sulfatés.

10) Extrait selon la revendication 8 ou la revendication 9, caractérisé en ce que la séparation est réalisée à l'aide d'une membrane cellulosique de dimensions de pores comprises entre 1 000 et 50 000 daltons.

11) Extrait selon la revendication 8 ou la revendication 9, caractérisé en ce que la précipitation est réalisée à l'aide d'éthanol.

12) Utilisation de l'extrait selon la revendication 7, comme anti-oxydant dans la fabrication des polymères.

10 13) Utilisation de l'extrait selon la revendication 7 ou la revendication 8 dans la préparation de compositions diététiques anti-stress oxydatif.

14) Utilisation de l'extrait selon la revendication 7 ou la revendication 8 pour la conservation de produits alimentaires.

15 15) Utilisation de l'extrait selon la revendication 7 dans la préparation de produits cosmétiques destinés à ralentir le vieillissement cutané.

16) Utilisation de l'extrait selon la revendication 7 dans la préparation de compositions anti-inflammatoires, notamment en rhumatologie.

17) Utilisation de l'extrait selon la revendication 9 dans la préparation de compositions destinées à la lutte biologique contre les parasites végétaux.